

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞の膜電流

—Leibovitz's L-15 Medium の影響—

高橋 恭一

(受付 2012 年 3 月 27 日)

序 論

脊椎動物網膜視細胞は光感受性の違いと形態学的な差異に基づき、錐体と桿体の2種類に分類される(第1図A)。錐体は光感受性が低く昼光視(昼間の視覚[色覚を含む])そして桿体は光感受性が高く薄明視(夕方および夜間の視覚)における光受容機能を担っている。網膜が光照射されると、視細胞外節に存在する視物質(光感受性物質)に構造変化が生じ、この結果外節内で一連の酵素反応が進行する。最終的に外節内の cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) 濃度が低下するため、外節の形質膜に発現する cGMP 依存性陽イオンチャネル(光感受性[陽]イオンチャネルとも呼ばれる)は閉塞し、外節内への陽イオン(主に、ナトリウムイオン $[Na^+]$ やカルシウムイオン $[Ca^{2+}]$)の流入が止まる。このため、視細胞は過分極する(Tomita *et al.*, 1967; Penn & Hagins, 1969; Toyoda *et al.*, 1969; Hagins *et al.*, 1970; Kawamura, 1993, 1994)。この過分極は、視細胞終末から放出される L-グルタミン酸量を減少させる(Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995)。一方、暗時、多量の cGMP が外節内に存在するため、cGMP 依存性陽イオンチャネルは開口状態となり、このイオンチャネルを通じて外節内に流入する陽イオンによって視細胞は脱分極する。この脱分極は、視細胞終末から放出される L-グルタミン酸量を増加させる。錐体と桿体では外節部に存在する視物質の種類が異なるものの、cGMP 依存性陽イオンチャネル開閉のメカニズム(電位応答発生機構)は概ね同じである(Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994)。暗時に視細胞終末から放出された L-グルタミン酸はシナプス間隙を拡散し、第二次神経細胞(双極細胞および水平細胞)に発現するシナプス受容体(リガンド受容体)に到達する。

色覚を有する下等脊椎動物(魚類、両生類と爬虫類)網膜には三原色光(すなわち、短波長光[青色領域の光]、中波長光[緑色領域の光]そして長波長光[赤色領域の光])のそれぞれに対して最大過分極を示す錐体(赤錐体、緑錐体と青錐体)が存在する(MacNichol &

Svaetichin, 1958; Tomita *et al.*, 1967)。何れの錐体も、暗時に L-グルタミン酸を放出することが知られている (Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1988, 1991; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen & Jahr, 1989)。この L-グルタミン酸は水平細胞のシナプス下膜に発現する Kainic acid (KA)/(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体 (イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の一種) を活性化し、この細胞を脱分極に導く (Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1988, 1991)。網膜が光照射されると、錐体から放出される L-グルタミン酸量は減少し、グルタミン酸受容体の活性は低下する。このため、水平細胞は明時に過分極する。3種類の錐体で形成された光応答は、異なる水平細胞 (3種類の錐体水平細胞) にシナプス伝達される。赤錐体から直接的なシナプス入力を受け取る水平細胞は、赤錐体同様に総ての可視光に対して過分極応答を示す (勿論、長波長光 [赤色領域の光] での網膜照射によって最大過分極応答を発生する)。ところが、緑錐体から直接的なシナプス入力を受け取る水平細胞は、短波長光 (青色領域の光) と中波長光 (緑色領域の光) を用いた網膜照射によって過分極応答を示すが、長波長光 (赤色領域の光) を用いた網膜照射では脱分極応答を発生する。そして、青錐体から直接的なシナプス入力を受け取る水平細胞は、短波長光 (青色領域の光) と長波長光 (赤色領域の光) を用いた網膜照射によって過分極応答を示すが、中波長光 (緑色領域の光) を用いた網膜照射では脱分極応答を発生する。このように、錐体で形成された三原色応答は水平細胞において見事に反対色応答に変換される (MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1963, 1965; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Byzov & Shura-Bura, 1986; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995)。水平細胞が示す光応答を指標に、魚類網膜の錐体水平細胞は単相性水平細胞 (赤錐体から直接的なシナプス入力を受け取る水平細胞)、二相性水平細胞 (緑錐体から直接的なシナプス入力を受け取る水平細胞) および三相性水平細胞 (青錐体から直接的なシナプス入力を受け取る水平細胞) と呼ばれている (MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1963, 1965)。錐体での三原色応答が水平細胞での反対色応答に変換されるしくみについては未だ完全に解明されているわけではないが、水平細胞から錐体への抑制性シナプスが関与していると考えられている (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995)。同種の水平細胞同士は電気シナプスを介して繋がっており、その受容野サイズは数 mm に及ぶ (Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Witkovsky *et al.*, 1983; Baldrige *et al.*, 1987, 1998; Vaney, 1993)。この受容野情報は、水平細胞から錐体への抑制性シナプスを介して間接的に双極細胞にまで伝播され、結果として双極細胞の同心円型中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野応答の形成に与かると考えられて

いる (Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978; Davis & Naka, 1980)。つまり、水平細胞から錐体への抑制性シナプスは、反対色過程の形成のみならず周辺受容野の形成にも関与している。桿体は錐体水平細胞とのシナプス連絡はなく、桿体水平細胞とのみシナプス連絡している。桿体水平細胞も細胞同士が電気シナプスを介して結合し、錐体水平細胞と同様に大きな受容野を形成している (Tomita, 1965; Tsukamoto *et al.*, 1987)。

上記のように、反対色過程ならびに周辺受容野の形成に関し、水平細胞が重要な役割を演じていることは明らかであった。しかし、水平細胞は大きく且つ細胞同士が電気シナプスを介して結合しているため、当時主流であったガラス管微小電極法では詳細な解析が難しく、反対色過程ならびに周辺受容野の形成における水平細胞の役割を完全に解明するには至らなかった (例えば, Stell *et al.*, 1975; Toyoda & Tonosaki, 1978)。1980年代前半、魚類網膜から水平細胞を単離そして培養する技術が開発され、急性あるいは培養水平細胞を用いた生理学研究、特にリガンド受容体 (シナプス受容体) や電位依存性イオンチャネルの解析が始まった (Tachibana, 1981, 1983; Lasater & Dowling, 1982; Shingai & Christensen, 1983, 1986)。この結果、水平細胞に発現するグルタミン酸受容体、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体やドーパミン受容体、そしてカルシウムチャネルやカリウムチャネルなどに加え、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換ポンプや GABA トランスポーターなどに関する生理学的・薬理学的研究が急速に進んだ (例えば, Dixon *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993; Schwartz, 1982, 1987, 2002)。1980年代後半、単離・培養技術は魚類以外の動物種にも普及し、また水平細胞以外の網膜細胞にも導入されるようになった。1990年代に入ると、脳研究で開発されたスライス標本が網膜研究にも適用されるようになり、網膜スライス標本を用いて単一シナプスの解析が始まった。単離・培養細胞を利用した単一神経細胞の興奮性の解析にスライス標本を利用した単一シナプスの解析が加わり、網膜を構成する個々の神経細胞ならびにこれらの神経細胞が形成する神経回路に関する知見が一段と増した。勿論、反対色過程ならびに周辺受容野の形成に関する研究にも進展があり、水平細胞から錐体への抑制性シナプス以外に、錐体終末部の細胞外水素イオン濃度変化が関与する新たなしくみが明らかとなった (Hirasawa & Kaneko, 2003; Vessey *et al.*; 2005; Cadetti & Thoreson, 2006)。ところが、水平細胞の役割は依然完全に解明されたわけではなく、科学技術の進歩に伴い新たな疑問が次々と浮上している。

水平細胞を網膜内から単離する際、網膜を酵素 (パパイイン) 処理し、その後パスツールピペットなどを用いて機械 (物理的) 的に単離する方法が一般的である (Tachibana, 1981)。単離した水平細胞は Concanavalin A (Con A) などの細胞接着因子で被覆したカバーガラスに接着させ、生理実験に供する。また、培養水平細胞を生理実験に用いるとき、単離水平細胞を Con A などで被覆したカバーガラスの上に置き、無機塩類にアミノ酸類やビタミン類な

どを添加した培養液（例えば、Leibovitz's L-15 Medium や Medium 199）を加え培養（培養温度：10°C～16°C）した（Tachibana, 1981, 1983; Dixon *et al.*, 1993）。これらの培養液中で、水平細胞は長期間生存することが報告されている（例えば、Tachibana, 1981, 1983; Dixon *et al.*, 1993; 高橋, 2000, 2012a）。ただし、培養期間が長くなると、樹状突起は退縮し、水平細胞の形態が円形や楕円形へと変化した（高橋, 2000, 2012a）。円形や楕円形に変化した水平細胞から突起が伸展することも報じられている（Tachibana, 1983）。水平細胞は培養期間の長期化に伴いその形態が大きく変化するにもかかわらず、生理応答に顕著な変化は認められなかった（Tachibana, 1981, 1983; Shingai & Christensen, 1986; DeVries & Schwartz, 1992）。ただし、培養期間の長期化に伴い、これらの生理応答（例えば、L-グルタミン酸投与に伴い発生する膜電流応答〔グルタミン酸電流〕や電位依存性カルシウム電流）は減少する傾向にあった（高橋, 2000）。最近、高橋（2012a）は培養期間の長期化に伴い水平細胞の生理応答が減少するしくみを探ることを目的として、アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞を Leibovitz's L-15 Medium を含む培養液（L-15 培養液）以外に、ビタミン類やアミノ酸類を全く含まない無機塩類のみで作製した培養液（無機塩類培養液）で培養し、両培養液における水平細胞の形態学および生理学的変化を比較する実験を行った。この結果、L-15 培養液で培養した水平細胞は無機塩類培養液で培養した水平細胞よりも長期間生存し、また樹状突起の退縮が緩徐であることが明らかとなった。実際、L-15 培養液中で水平細胞は4週間もの長期間生存したが、無機塩類培養液中での生存は10日以内であった。不思議なことに、無機塩類培養液で培養した水平細胞はL-15 培養液で培養した水平細胞よりも、L-グルタミン酸（100 μ M）投与に伴い発生する膜電流変化（グルタミン酸電流）が有意に大きいことが判明した。さらに、低温（4°C）の無機塩類培養液中で水平細胞を培養したとき、培養に伴うグルタミン酸電流の低減が遅延することも明らかとなった。

無機塩類培養液で培養した水平細胞に発生するグルタミン酸電流がL-15 培養液で培養した水平細胞に比べて有意に大きいという結果は、Leibovitz's L-15 Medium の成分中にグルタミン酸受容体の活性を修飾（抑制性の修飾作用）する成分が含まれている可能性を示唆している。Leibovitz's L-15 Medium は細胞培養に一般的に用いられている人工培地であり、これまでの研究を通覧しても Leibovitz's L-15 Medium がグルタミン酸受容体を修飾するという報告はない。本論文では、L-15 培養液で培養した水平細胞のグルタミン酸電流が無機塩類培養液で培養した水平細胞のグルタミン酸電流よりも低減する原因を明らかにするため、アメリカナマズ網膜から単離した直後の錐体水平細胞に対する Leibovitz's L-15 Medium の影響を調べた。

実験材料と方法

アメリカナマズ網膜からの錐体水平細胞の単離

実験には、体長約 35~45 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜から錐体水平細胞を単離し、培養した。本研究で用いた単離法を以下に概説する。水を用いて低温麻酔したアメリカナマズを約60分間暗順応し、ギロチンを用いて断頭後、直ちに脳および脊髄の両側を穿刺した。雑菌の混入を防ぐため、頭部をクリーンベンチ（滅菌箱）内に移し、眼球を摘出した。摘出眼球を70%エタノールに20秒間浸し、滅菌した。この眼球を pH 7.6 に調整した単離操作液（125.0 mM 塩化ナトリウム [NaCl], 1.0 mM リン酸水素二ナトリウム [Na₂HPO₄], 2.5 mM 塩化カリウム [KCl], 2.5 mM 塩化カルシウム [CaCl₂], 0.5 mM 塩化マグネシウム [MgCl₂], 0.5 mM 硫酸マグネシウム [MgSO₄], 10.0 mM ブドウ糖 [Glucose], 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid [HEPES], 0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン [BSA]）で数回洗浄し、前眼部、水晶体および硝子体を除去後、網膜を剥離した。この剥離網膜を 2 mm 幅に切断し、1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH 7.0 に調整した Papain 溶液（10 U/ml Papain [タンパク質分解酵素], 125.0 mM NaCl, 1.0 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KCl, 10.0 mM Glucose, 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム, 5.0 mM L-システイン, 5.0 mM Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) *N*, *N*', *N*', *N*'-tetraacetic acid [EGTA], 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA) に移し、28°C で20分間振盪した。この後、Papain 溶液を除去し、網膜片を4°C の単離操作液を用いて5回洗浄した。これらの網膜片をプラスチック製試験管（容量 15 ml ; Becton Dickinson）に移し、1.5 ml の単離操作液を加え、先端口径を約 1 mm にファイアポリッシュしたパスツールピペット（Becton Dickinson）を用いて5回出し入れ（ピペッティング [機械的単離操作]）した。比較的大きな網膜片が沈殿するのを待ち、上澄み（細胞浮遊液；約 1 ml）をガラス製試験管（容量 6 ml ; Fisher Scientific Co.）に移し、4°C で保存した。再び、網膜片が存在する試験管に単離操作液を1.5 ml 補充し、パスツールピペットによる出し入れ（ピペッティング）を5回行い、網膜片の沈殿後に細胞浮遊液を試験管に移し、4°C で保存した。この操作を、網膜片がなくなるまで続けた。この結果、30~35本の細胞浮遊液を含む試験管を得ることができた。それぞれの試験管から 20 μ l の細胞浮遊液を採取しスライドガラスに置き、倒立型位相差顕微鏡（TMS-F, Nikon）で観察した。水平細胞が複数認められる試験管を残し、これらの試験管の細胞浮遊液を本研究に用いた。細胞浮遊液には樹状突起や軸索を有する細胞に加え、多数の球体（視細胞、双極細胞、アマクリン細胞や神経節細胞の細胞体）が認められた。網膜を構成する神経細胞の形態学的特徴は

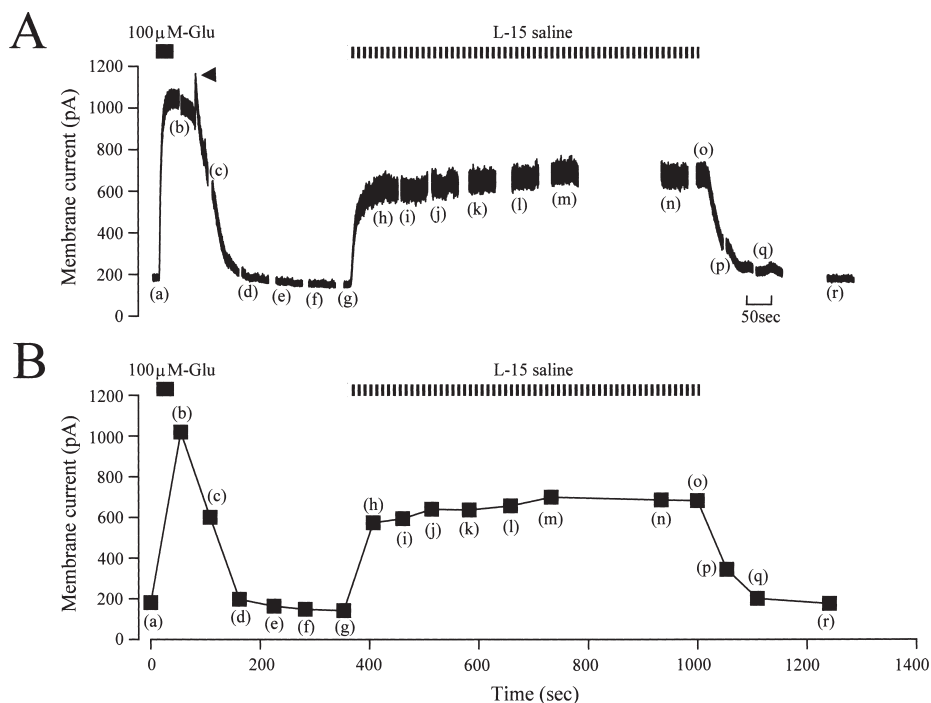
細胞内染色法を用いて詳細に調べられており、これに基づき単離後の網膜細胞を識別することは可能であった（例えば、Kaneko, 1970, 1971; Naka & Otsuka, 1974; Copenhagen & Owen, 1976; Murakami & Shimoda, 1977; Famiglietti *et al.*, 1977; Otsuka, 1978; Tauchi *et al.*, 1990; Shimoda *et al.*, 1992）。特に、細胞の大きさと特徴的な形態から、錐体水平細胞の識別は容易であった。本研究では、単離後 6 時間以内の錐体水平細胞を用いた。

水平細胞の膜電流導出とリンガー液の灌流

ピペットマンを用いて細胞浮遊液を 100 μl 吸引し、これを倒立型位相差顕微鏡（TMD, Nikon）に装着した記録槽（容量；455 μl ）に移した後、水平細胞が記録槽底部（厚さが 0.017 mm のガラス板 [カバーガラス]）に沈むまで 10 分間程静置し、正常リンガー液あるいは標準リンガー液を灌流した。記録槽底面のガラス板への水平細胞の接着は弱く剥がれ易いことを考慮し、本研究では先端口径が比較的大きな Y-tube（直径：250 μm ）を作製し、これを水平細胞から 5~7 mm の距離に置きリンガー液の灌流に利用した。記録槽底部のガラス板に付着した水平細胞が、リンガー液の灌流によって剥がれることは殆どなかった。各種の薬剤投与も、この Y-tube を用いて行った。Y-tube による溶液の灌流速度は 390 $\mu\text{l}/\text{分}$ であった。ただし、この灌流では水平細胞周辺の速やかな溶液灌流と交換（各種薬剤の水平細胞への導入と除去）を保証できず、脱感作を示す膜電流応答を解析することは困難であった。

水平細胞に Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、膜電流を記録した（Hamil *et al.*, 1981）。膜電流記録用パッチ電極は Brown-Flaming 型微小電極製作器（Model-P97, Sutter Instrument Co.）を使い、Borosilicate 性ガラス管（Garner Glass Co.）から作製した。電極抵抗は 5~8 M Ω であった。不関電極として、150 mM NaCl と 1.5% 寒天を含む塩橋に接続した銀-塩化銀電極を用いた。膜電流記録用パッチ電極と不関電極の液間電位を測定すると、記録用電極が 4~6 mV 負となった。本実験ではこの液間電位を考慮し、膜電位を -5 mV 補正して表示した。膜電流記録は室温（20~23°C）で実施した。水平細胞から導出した膜電流は Whole-cell voltage-clamp 用増幅器（Axopatch-1 D, Axon Instrument）に内蔵した 4 次ベッセルフィルター（2 KHz）を經由後 A/D コンバーター（ITC-16, HEKA Instruments Inc.）介して 10 KHz でデジタル化し、マッキントッシュコンピューター（MacOS X [10.2]）内臓のハードディスクに保存した。水平細胞の膜電位の制御（膜電位固定ならびに鋸波状膜電位変化）とデータ獲得には、Patchmaster（HEKA Instruments Inc.）を利用した。

本研究では、網膜から単離した水平細胞の膜電位を +35 mV に固定し、L-グルタミン酸などの投与あるいは L-15 リンガー液の灌流に伴い発生する膜電流変化を記録・保存した（第 1 図）。既述したように、本研究ではリンガー液の灌流が緩やかであり、これに伴う溶液交換や薬剤投与も緩やかであるため発生する膜電流変化も緩徐であり、このため長時間の記録・



第 1 図：アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の膜電流変化

A：アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100 \mu\text{l}$ を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約40分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35 \text{ mV}$ に固定すると、この水平細胞には $+180 \text{ pA}$ 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸（Glu； $100 \mu\text{M}$ ）を投与すると、 1020 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流すと、数分かけて元の膜電流にまで戻った。次に、標準リンガー液を L-15リンガー液（L-15 saline）に交換し、灌流を行った。L-15リンガー液の灌流に伴う外向き電流が発生し、 $+575 \text{ pA}$ に達した。L-15 リンガー液を灌流し続けると、外向き電流はさらに増大し、約10分後には $+680 \text{ pA}$ に到達した。標準リンガー液に戻ると、数分かけて元の膜電流にまで戻った。グルタミン酸の投与そして L-15 リンガー液の灌流を通じて、膜電流変化は50秒間毎に記録・保存され、これらを繋ぎ合わせて長時間記録を作製した。50秒間記録の保存には若干の時間を要したため、長時間記録では50秒毎に数秒以内の未記録部分が生じた。L-グルタミン酸の除去、標準リンガー液の灌流中そして L-15 リンガー液の灌流中には、膜電流に大きな変化が認められなかったため、記録・保存を中断した（例えば、(d) と (e)、(j) と (k)、(k) と (i)、(m) と (n)、(q) と (r) など）。L-グルタミン酸除去の際、膜電流に不測の乱れが生じた（(b) の黒矢）。B：膜電流記録を開始した時点 (a) を 0 とし、それぞれの膜電流記録の最初の膜電流値を測定時間に対してプロットシテグラフ化した。このグラフでは50秒間記録の初期電流値をプロットするため、記録の途中で大きな膜電流変化（例えば、A (b) と B (b) の比較）が生じてても、この変化はグラフに表れない。

保存を行う必要があった。本研究では、膜電流変化を50秒間記録・保存した。さらに長時間の膜電流記録が必要なとき、50秒間の記録・保存を繰り返し複数の膜電流記録を得、これらを繋ぎ合わせた（第 1 図 A (a)～(r)）。50秒間の膜電流変化をデジタル化してハードディスクに保存する際若干の時間を要するため、膜電流記録間に数秒以内の未記録部分が生じた（第

1 図 A)。また、水平細胞の膜電流に変化が認められないとき（例えば、薬剤を投与しないときや薬剤投与に伴い惹起された膜電流変化が定常状態に達しているとき）、記録・保存を中断した（例えば、第 1 図 A の (j) と (K) の間、(m) と (n) の間や (q) と (r) の間など）。20分以上にも亘る長時間の膜電流記録を行うとき、得られた各膜電流記録の初期電流値を記録時間（膜電流記録を開始した時点をも [0] とする）に対してプロットしグラフ化した（第 1 図 B (a)～(r)）。このグラフの各プロットは50秒間記録の初期電流値であるため、50秒間記録の途中で膜電流変化が生じた場合、グラフ上にこの変化が反映されることはない。実際、第 1 図 A の (b) では不測の膜電流変化が生じたが、この変化は第 1 図 B のプロットには現れない。勿論、50秒間膜電流記録の途中で生じた変化が生理応答である場合、グラフ化せず、膜電流記録をそのまま使用することにした。このように、グラフ化には短時間の膜電流変化が反映されないという欠点はあるものの、膜電流の経時的変化を通覧する際大変便利であり、本研究での膜電流変化の表示に用いた。電流－電圧関係を調べる目的で、水平細胞に鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を50秒間記録の合間に与え、発生する膜電流変化（電流－電圧関係）を記録した（第 2 図 B と第 5 図 B）。水平細胞に対する薬剤投与の影響を調べる際、薬剤投与中の膜電流変化から投与前の膜電流変化を差し引き、イオンチャネル活性に基因する膜電流成分を取り除いた膜電流変化（電流－電圧関係）を求めた（第 5 図 B）。保存した膜電流の解析には、Igor Ver. 5.0 (Wavemetrics Inc.) を用いた。

リンガー液とパッチ電極内液の組成

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を灌流する正常リンガー液の組成は、120.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。本研究で採用している膜電位固定（+35 mV）では外向き整流性カリウムチャネルが活性化する可能性があり、このカリウムチャネル活性を抑えるため、正常リンガー液の NaCl を 20 mM 減じ、代わりに 10 mM 塩化セシウム（CsCl）と 10 mM Tetraethylanmonium-Cl（TEA-Cl）を加えた標準リンガー液を作製し使用した。水平細胞に対する Leibovitz's L-15 Medium の影響を調べる際、Leibovitz's L-15 Medium を添加したリンガー液（L-15リンガー液）（Leibovitz's L-15 Medium [浸透圧調整のため85%に希釈して使用], 0.3 mM アスコルビン酸, 10.0 mM HEPES）を作製し、Y-tube を通じて灌流した（Leibovitz, 1963）。L-15 リンガー液は無機塩類以外に、17種類のアミノ酸と7種類のビタミンを含んでいる（第 1 表）。単離操作液、Papain 溶液、正常リンガー液、標準リンガー液そして L-15リンガー液などは作製後、必ず浸透圧を測定した（5500 Vapor Pressure Osmometer, Wescor Inc.）。これらの溶液の浸透圧は、265～280 mOsm/kg であった。L-グルタミン酸とそのアゴニストは浸透圧の変化を考慮せず、リンガー液に添加し Y-tube で投与した。何れのリンガー液にも 0.1

第1表 Leibovitz's L-15 Medium の組成

	成分	濃度 (mg/ℓ)	モル濃度(mM)
無機塩類	NaCl	8000	137.93
	KCl	400	5.33
	CaCl ₂	140	1.26
	MgCl ₂	93.7	0.986
	MgSO ₄	97.67	0.814
	Na ₂ HPO ₄	190	1.34
	KH ₂ PO ₄	60	0.441
その他	D-(+)-Galactose	900	5
	Sodium pyruvate	550	5
	Phenol red	10	0.0251
アミノ酸類	L-Alanine	225	2.53
	L-Arginine	500	2.87
	L-Asparagine	250	1.89
	L-Cysteine	120	0.992
	L-Glutamine	300	2.05
	Glycine	200	2.67
	L-Histidine	250	1.61
	L-Isoleucine	250	1.91
	L-Leucine	125	0.954
	L-Lysine	75	0.514
	L-Methionine	75	0.503
	L-Phenylalanine	125	0.758
	L-Serine	200	1.9
	L-Threonine	300	2.52
	L-Tryptophan	20	0.098
L-tyrosine	300	1.66	
L-Valine	100	0.855	
ビタミン類	D-Calcium pantothenate	1	0.0021
	Choline Chloride	1	0.00714
	Folic acid	1	0.00227
	i-Inositol	2	0.0111
	Niacinamide	1	0.0082
	Pyridoxine hydrochloride	1	0.00485
	Riboflavin 5'-phosphate Na	0.1	0.000209
Thiamine monophosphate	1	0.00226	

GIBCO の Leibovitz's L-15 Medium 組成表に基づき作製した。

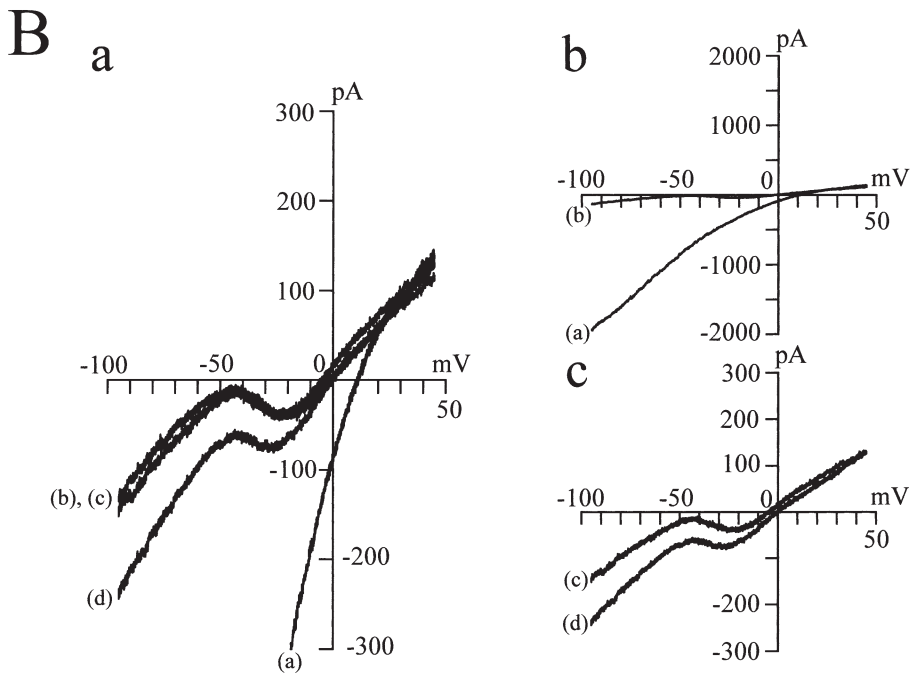
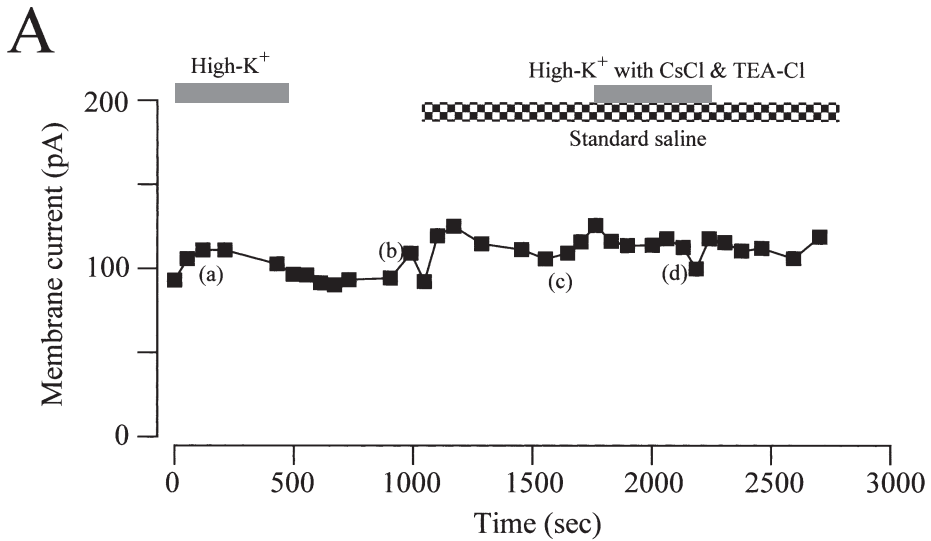
無機塩類の化学式：NaCl (塩化ナトリウム), KCl (塩化カリウム), CaCl₂ (塩化カルシウム), MgCl₂ (塩化マグネシウム), MgSO₄ (硫酸マグネシウム), Na₂HPO₄ (リン酸水素二ナトリウム), KH₂PO₄ (リン酸二水素カリウム)

mg/ml BSA を加え, そして 1 N-NaOH を用いて pH 7.6 に調整し灌流した。

カリウムチャネル活性を抑えるため, リンガー液に CsCl と TEA-Cl を添加することに加え, パッチ電極内液に KCl の代わりに CsCl を用いた。パッチ電極内液の組成は 120.0 mM CsCl, 1.0 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM EGTA, 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 1.0 mM Guanosine 5'-triphosphate (GTP), 10 mM HEPES で

あった。本研究では、総ての実験においてこのパッチ電極内液を用いた。パッチ電極内液の浸透圧は、260~265 mOsm/kgであった。パッチ電極内液は、1 N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH7.2 に調整し用いた。

正常リンガー液の灌流中、水平細胞の内向き整流性カリウムチャンネルは-70 mV 付近よりも負の膜電位（過分極側）で、そして外向き整流性カリウムチャンネルは-30 mV 付近よりも



正の膜電位（脱分極側）で活性化することが知られている（例えば、Tachibana, 1983）。本研究で採用した実験条件下（CsClを充填したパッチ電極内液およびCsClとTEA-Clを添加した標準リンガー液）で、水平細胞に発現する両カリウムチャンネルは概ね抑えられていると予想される。しかし、L-15リンガー液の影響を調べる実験（パッチ電極にはCsClを充填）において、L-15リンガー液はCsClもTEA-Clも含まず、水平細胞を+35 mVに膜電位固定したとき外向き整流性カリウム電流が発生する可能性がある。そこで、CsClもTEA-Clも添加しない実験条件下（正常リンガー液の灌流）で、+35 mVに膜電位固定した水平細胞に外向き整流性カリウム電流が発生するの可否を調べた（第2図）。アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から100 μ lを取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、正常リンガー液を約30分間灌流し、膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を+35 mVに固定すると、この細胞には+95 pA程の膜電流（保持電流）が現れた（第2図A）。正常リンガー液のNaClを120 mMから72.5 mMに減少そしてKClを2.5 mMから50 mMに増加した高 K^+ 正常リンガー液（High- K^+ ）を作製し、灌流した。この高 K^+ 正常リンガー液を灌流すると、膜電流に20 pA程の一過性増加が現れたが、数分後には元の膜電流へと戻った。

第2図：水平細胞に発現する電位依存性カリウムチャンネルの活性化

A：アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から100 μ lを取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、正常リンガー液を約30分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を+35 mVに固定すると、約+95 pAの膜電流（保持電流）が現れた。正常リンガー液を高 K^+ 正常リンガー液（High- K^+ ）に交換し灌流すると、膜電流は一過性に+110 pA付近まで増加したが、緩やかに+100 pA付近に戻った。正常リンガー液に戻すと、膜電流は+100 pA付近で維持された。次に、正常リンガー液を標準リンガー液（Standard saline）に交換し灌流した。リンガー液の交換時に一過性に膜電流は+125 pA付近にまで増加したが、その後膜電流は+110 pA～+120 pAに維持された。標準リンガー液を高 K^+ 標準リンガー液（High- K^+ with CsCl & TEA-Cl）に交換し灌流しても、膜電流に顕著な変化は認められなかった。+35 mVに膜電位固定した水平細胞に対する各種のリンガー液の影響を調べたが、膜電流変化は10～20 pAと微弱であった。B：水平細胞を各種リンガー液で灌流しているとき、鋸波状の膜電位変化（-95～+45 mV, 500ミリ秒）を与え、膜電流変化（電流-電圧関係）を記録した。Baでは、高 K^+ 正常リンガー液（a）、正常リンガー液（b）、標準リンガー液（c）、そして高 K^+ 標準リンガー液（d）の灌流中の膜電流変化（電流-電圧関係）を記録し、重ねて表示した。正常リンガー液（b）と標準リンガー液（c）の灌流中に得られた膜電流変化（電流-電圧関係）は、殆ど一致していた。高 K^+ 正常リンガー液（a）を灌流したとき、+10 mVよりも負の膜電位で大きな内向き電流（内向き整流性カリウム電流；細胞外 K^+ 濃度を2.5 mMから50 mMに上げたため、内向き整流性カリウム電流の活性化電位が正側の膜電位に移動した）が観察された。しかし、CsClとTEA-Clを含む高 K^+ 標準リンガー液（d）を灌流すると、この内向き電流（内向き整流性カリウム電流）は著しく減少した。Baから明らかなように、+20 mVよりも正の膜電位では何れのリンガー液を灌流しても、膜電流に大きな差異は認められなかった。つまり、本実験（CsClを充填したパッチ電極内液の使用）において水平細胞に外向き整流性カリウム電流は発生しないことを示唆している。ただし、リンガー液へのCsClとTEA-Clの添加の有無は、内向き整流性カリウムチャンネル活性に大きく影響した。Bbでは、高 K^+ 正常リンガー液（a）と正常リンガー液（b）の灌流中に錐体水平細胞が示す膜電流変化（電流-電圧関係）を、縦軸（電流軸）のスケールを調整し、重ねて表示した。Bcでは、標準リンガー液（c）と高 K^+ 標準リンガー液（d）灌流中に水平細胞が示す膜電流変化（電流-電圧関係）を重ねて表示した。

正常リンガー液に戻しても、膜電流に大きな変化は見られず、+100 pA 程を維持した。正常リンガー液を標準リンガー液 (Standard saline) に代えて灌流すると、水平細胞の膜電流は一過性に+100 pA から+125 pA 程まで増加したが、直ぐに+115 pA 付近にまで戻り、この膜電流に維持された。標準リンガー液の NaCl を 100 mM から 52.5 mM に減少そして KCl を 2.5 mM から 50 mM に増加した高 K^+ 標準リンガー液 (High- K^+ with CsCl & TEA-Cl) を作製し、灌流した。この高 K^+ 標準リンガー液を灌流すると、膜電流には微弱な一過性増加が現れたが、直ぐに+115 pA 付近まで戻り、この膜電流で維持された。標準リンガー液に戻しても、膜電流に大きな変化は認められなかった。第 2 図 A の結果から、CsCl も TEA-Cl も含まない正常リンガー液の灌流中、+35 mV に膜電位固定した水平細胞に外向き整流性カリウム電流は発生しないことが示唆された。次に、各種のリンガー液の灌流中、鋸波状の膜電位変化 (-95 ~ +45 mV, 500 ミリ秒) を与え、膜電流変化 (電流 - 電圧関係) を観察した (第 2 図 Ba, Bb と Bc)。高 K^+ 正常リンガー液を灌流したとき、+30 mV よりも負の膜電位で直線的に増加する内向き電流 (内向き整流性カリウム電流; 細胞外 K^+ 濃度を 2.5 mM から 50 mM に上げたため、内向き整流性カリウム電流の活性化電位が正の膜電位に移動した。) が発生した。しかし、正常リンガー液の灌流では、この内向き整流性カリウム電流は殆ど認められなかった (第 2 図 Ba (a) と (b) そして Bb (a) と (b))。正常リンガー液を標準リンガー液に交換し灌流しても、膜電流 (電流 - 電圧関係) に大きな変化は生じなかった (第 2 図 Ba (b) と (c))。ただし、高 K^+ 標準リンガー液を灌流すると、高 K^+ 正常リンガー液の灌流時ほどではないが、内向き電流 (内向き整流性カリウム電流) の増加が認められた (第 2 図 Ba (c) と (d) そして Bc (c) と (d))。同様の実験を別の個体から単離した 2 つの水平細胞で実施し、概ね同じ結果を得た。第 2 図の実験を通じて、+35 mV に膜電位固定した水平細胞から外向き整流性カリウムチャンネル活性に基因する膜電流変化を記録することはできなかった。パッチ電極内に充填した CsCl によって、外向き整流性カリウムチャンネル活性が抑えられているためであろうと推測された。一方、内向き整流性カリウム電流はリンガー液への CsCl と TEA-Cl の添加の有無による影響を受けることが判明した。以上から、L-15 リンガー液を灌流したとき、+35 mV に膜電位固定した水平細胞に外向き整流性カリウム電流が含まれる可能性はないと推測された。

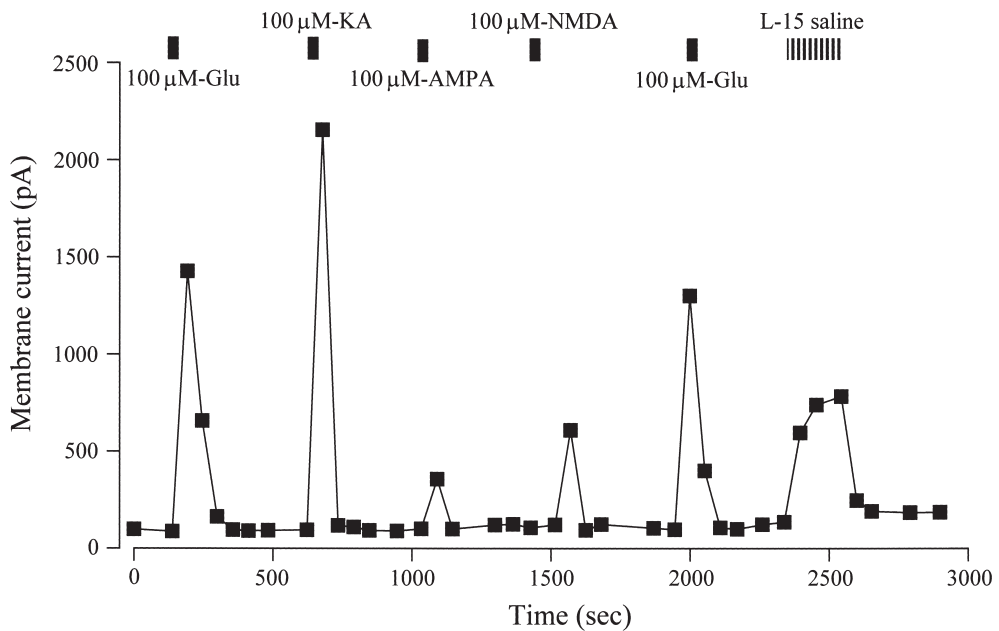
薬品類の多くは、Sigma-Aldrich Co. から購入した。また、Papain は Worthington Biochemical Co., (RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA), 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) と D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) は Tocris Biosciences, そして Leibovitz's L-15 Medium は Gibco から購入した。

実験結果

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の膜電流

水平細胞に対する L-グルタミン酸およびそのアゴニストの投与，ならびに L-15 リンガー液の灌流の効果調べた（第 1 図と第 3 図）。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り，記録槽に入れ約10分間静置した。その後，標準リンガー液を約40分間灌流し，水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると，この細胞には +180 pA 程の膜電流



第 3 図：L-グルタミン酸とそのアゴニスト類の投与および L-15 リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り，記録槽に入れ約10分間静置した。その後，標準リンガー液を約30分間灌流し，水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると，約 +100 pA の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM)，カイニン酸 (KA; 100 μM)，(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA; 100 μM) そして N-methyl-D-aspartate (NMDA; 100 μM) のそれぞれを連続して投与すると，水平細胞には約 1430 pA，約 2155 pA，約 360 pA そして約 610 pA の外向き電流が発生した。再度 L-グルタミン酸 (100 μM) を投与すると，約 1300 pA の外向き電流が現れた。この膜電流は，最初の L-グルタミン酸投与に比べて約 10% 減少していた。最後に，標準リンガー液を L-15 リンガー液 (L-15 saline) に交換し，約 200 秒間灌流した。時間経過の緩やかな外向き電流が発生し，約 780 pA に到達した。L-15 リンガー液から標準リンガー液に戻すと，膜電流は +180 pA まで戻った。

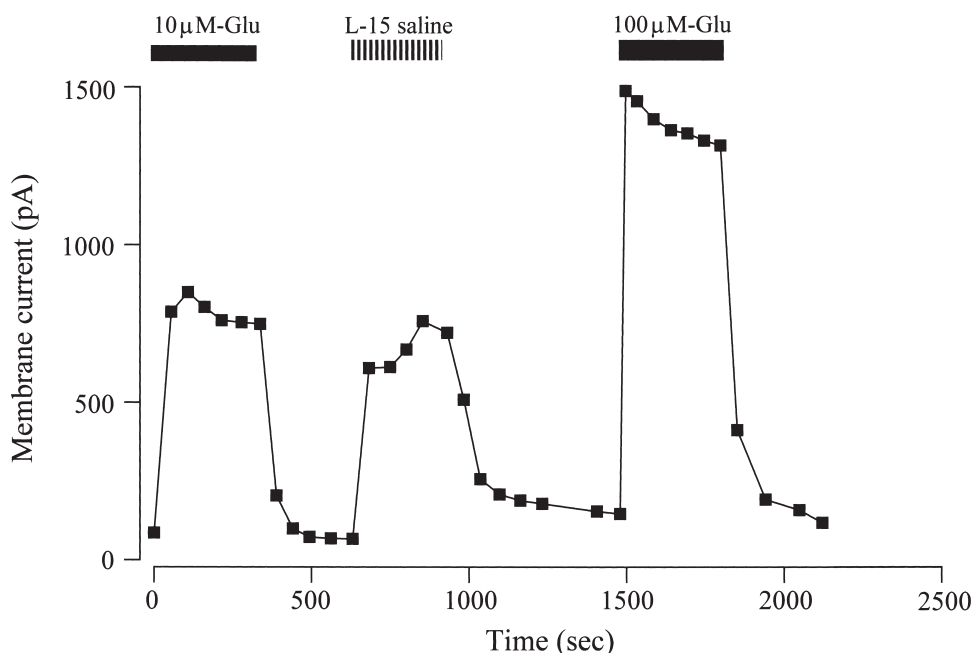
(保持電流)が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μ M) を投与すると、水平細胞には 1020 pA 程の外向き電流が発生した (第 1 図)。L-グルタミン酸を洗い流すと、数分後に膜電流は +140 pA 付近にまで戻った。次に、標準リンガー液を L-15 リンガー液に交換し、灌流した。L-15 リンガー液 (L-15 saline) の灌流に伴い、膜電流は約 +140 pA から約 +575 pA へと増加した。L-15 リンガー液の灌流を続けると、膜電流はさらに緩やかに増加し +680 pA に到達した。L-15 リンガー液から標準リンガー液に戻すと、数分かけて元の膜電流付近にまで戻った。L-グルタミン酸の投与と L-15 リンガー液の灌流の連続実験を通じて得られた 18 回分の膜電流記録のそれぞれの初期電流値を、記録した時間 (膜電流記録を開始した時点 [0] とする) に対してプロットシグナフ化した (第 1 図 B)。

異なるアメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 30 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +100 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μ M) とそのアゴニスト類 (100 μ M) の投与、そして L-15 リンガー液 (L-15 saline) の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化を記録した (第 3 図)。L-グルタミン酸、カイニン酸 (KA)、(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) そして N-methyl-D-aspartate (NMDA) を投与すると、水平細胞には約 1430 pA、約 2155 pA、約 360 pA そして約 610 pA の外向き電流が発生した。再度 L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞には 1300 pA 程の外向き電流が現れた。この膜電流変化は、最初の L-グルタミン酸投与に比べて 10% 程減少していた。最後に、標準リンガー液を L-15 リンガー液に交換し、約 200 秒間灌流した。L-15 リンガー液の灌流に伴い水平細胞には時間経過の緩やかな外向き電流が発生し、約 780 pA に到達した。L-15 リンガー液から標準リンガー液に戻すと、膜電流は +180 pA にまで戻った。

以上の結果から、L-15 リンガー液の灌流は水平細胞に膜電流変化を誘発することが明らかとなった。

L-グルタミン酸投与と L-15 リンガー液灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化の比較
水平細胞に対する L-グルタミン酸投与に伴い発生する膜電流変化と L-15 リンガー液の灌流に伴い発生する膜電流変化を比較する実験を行った (第 4 図)。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 30 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +90 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 10 μ M と 100 μ M) の投与と L-15 リンガー液 (L-15 saline) の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化を記録した (第 4 図)。L-グ



第4図：L-グルタミン酸の投与とL-15リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化の比較

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約30分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、約 $+90\ \text{pA}$ の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸（Glu; $10\ \mu\text{M}$ ）を投与すると、 $850\ \text{pA}$ 程の外向き電流が発生した。ただし、L-グルタミン酸を投与し続けると、膜電流は若干減少して一定になった。L-グルタミン酸を洗い流した後、L-15 リンガー液（L-15 saline）を灌流した。水平細胞には $610\ \text{pA}$ 程の外向き電流が現れ、L-15 リンガー液の灌流を続けると膜電流は緩やかに増加し約 $760\ \text{pA}$ に到達した。標準リンガー液に戻し、 $100\ \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を投与した。投与直後には約 $1500\ \text{pA}$ の外向き電流が現れたが、その後L-グルタミン酸の投与にもかかわらず膜電流は徐々に減少した。これを洗い流すと、数分かけて元の膜電流にまで戻った。

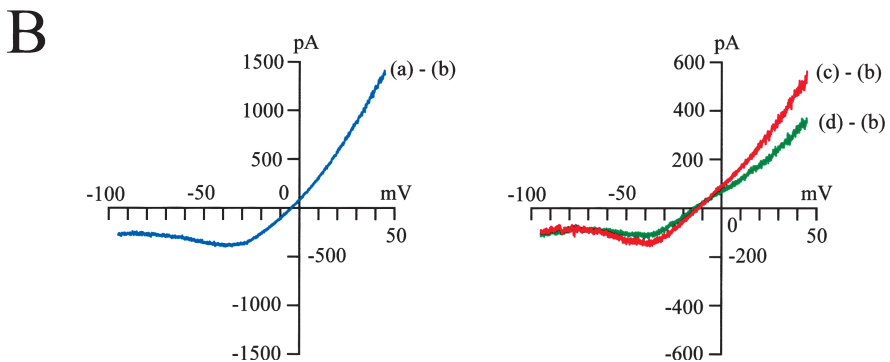
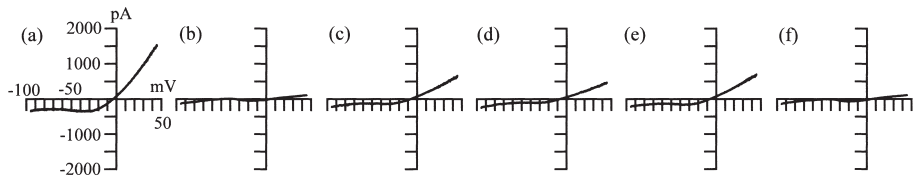
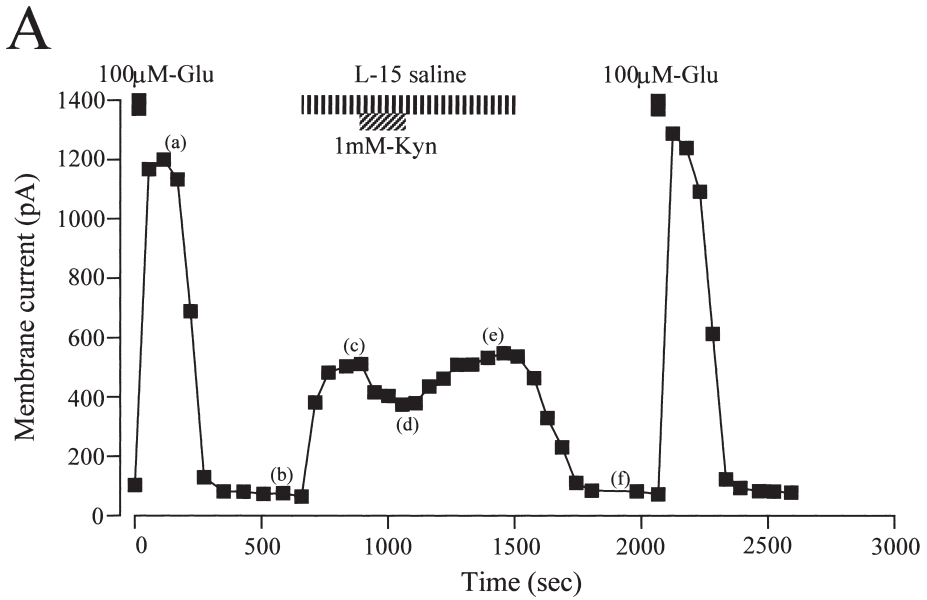
ルタミン酸（ $10\ \mu\text{M}$ ）を投与すると、水平細胞には $850\ \text{pA}$ 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流して膜電流が元に戻った後、L-15 リンガー液（L-15 saline）を灌流した。水平細胞には $610\ \text{pA}$ 程の外向き電流が現れ、L-15 リンガー液の灌流を続けると膜電流はゆっくり増加し約 $760\ \text{pA}$ に到達した。標準リンガー液に戻すと、数分かけて元の膜電流に戻った。次に、 $100\ \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を投与した。約 $1500\ \text{pA}$ の外向き電流が現れ、これを洗い流すと元の膜電流にまで戻った。

以上の結果から、水平細胞に対するL-15 リンガー液灌流の効果は $10\ \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸投与に匹敵することが明らかとなった。

L-15 リンガー液灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対するキヌレン酸の作用

L-15 リンガー液の灌流に伴い発生する膜電流変化に対するイオンチャンネル直結型グルタミン酸受容体の阻害剤の影響を調べた (第5図)。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約30分間灌流し、水平細胞から膜電流を



導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +100 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μ M) を投与すると、水平細胞には 1200 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流すと、数分かけて膜電流は +70 pA にまで戻った。次に、L-15 リンガー液 (L-15 saline) を灌流すると、水平細胞には 510 pA 程の外向き電流が発生した。L-15 リンガー液の灌流に伴い発生した外向き電流は、L-グルタミン酸投与に伴う膜電流変化に比べて時間経過が緩やかであった。L-15 リンガー液の灌流中、L-グルタミン酸受容体の阻害剤であるキヌレン酸 (1 mM) を投与すると、膜電流は +510 pA から +375 pA まで減少した。キヌレン酸を洗い流すと、数分後に膜電流は +550 pA にまで回復した。L-15 リンガー液から標準リンガー液に戻すと、外向き電流は減少し、膜電流は +80 pA にまで戻った。再度 L-グルタミン酸 (100 μ M) を投与すると、水平細胞には 1290 pA の外向き電流が発生した。この膜電流変化は、最初の L-グルタミン酸投与よりも 7.5% 程増加していた。これを洗い流すと、元の膜電流にまで戻った。

L-グルタミン酸の投与中と L-15 リンガー液の灌流中、水平細胞に鋸波状の膜電位変化 (-95 ~ +45 mV, 500 ミリ秒) を与え、発生する膜電流変化（電流 - 電圧関係）を調べた。L-グルタミン酸の投与に伴い水平細胞に発生する膜電流は -30 mV よりも正の膜電位で概ね直線的に増加するが、-30 mV 付近より負の膜電位で僅かに減少した（第 5 図 A 下図の (a) と B 左図 (a) - (b) [青色]）。この外向き整流性を示す膜電流変化（電流 - 電圧関係）は、

第 5 図：L-15 リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対するキヌレン酸の影響

A：アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 30 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、約 +100 pA の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μ M) を投与すると、1200 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流し、元の膜電流にまで戻った後、L-15 リンガー液 (L-15 saline) を灌流した。水平細胞には外向き電流が緩やかに発生し、約 510 pA に達した。L-15 リンガー液の灌流中、L-グルタミン酸受容体の阻害剤であるキヌレン酸 (1 mM) を投与すると、膜電流は +510 pA から +375 pA まで減少した。キヌレン酸を洗い流すと、数分かけて +550 pA にまで回復した。L-15 リンガー液から標準リンガー液に戻すと膜電流は減少し、+80 pA にまで戻った。再度 L-グルタミン酸 (100 μ M) を投与すると、水平細胞は 1290 pA 程の外向き電流を発生した。この膜電流変化は、最初の L-グルタミン酸投与よりも 7.5% 増加していた。これを洗い流すと、膜電流は +80 pA にまで戻った。A のグラフの下には、L-グルタミン酸投与中 (a)、標準リンガー液の灌流中 ((b) と (f))、L-15 リンガー液灌流中 ((c) と (e)) そして L-15 リンガー液灌流中にキヌレン酸を投与したとき (d) に、鋸波状の膜電位変化 (-95 ~ +45 mV, 500 ミリ秒) を水平細胞に与え、発生する膜電流変化（電流 - 電圧関係）を表示した。B：L-グルタミン酸投与中に得られた膜電流変化 (A (a)) から標準リンガー液灌流中に得られた膜電流変化 (A (b)) を差し引き、L-グルタミン酸を投与したときの実質的な膜電流変化（電流 - 電圧関係）を求め、表示した (B の左図 (a) - (b) [青色表示])。また、L-15 リンガー液灌流時に得られる膜電流変化 (A (c)) から標準リンガー液灌流時に得られた膜電流変化 (A (b)) を、そして L-15 リンガー液灌流中にキヌレン酸を投与した時に得られた膜電流変化 (A (d)) から標準リンガー液灌流時に得られた膜電流変化 (A (b)) を差し引き、L-15 リンガー液灌流中と L-15 リンガー液灌流中にキヌレン酸を投与した時の実質的な膜電流変化（電流 - 電圧関係）を求め、表示した (B の右図 (c) - (b) [赤色表示] と (d) - (b) [緑色表示])。

L-グルタミン酸投与に伴い N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体が主に活性化していることを示唆している。L-15リンガー液を灌流した場合にも、同様の外向き整流性の電流-電圧関係が観察された(第5図A下図の(c)と(e),そしてB右図(c)-(b)[赤色])。キヌレン酸を投与すると、総ての膜電位に亘って膜電流の減弱が観察された(第5図B右図(d)-(b)[緑色])。

以上の結果から、L-15リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化はグルタミン酸受容体の活性化に伴う膜電流成分を含んでいることが示唆された。

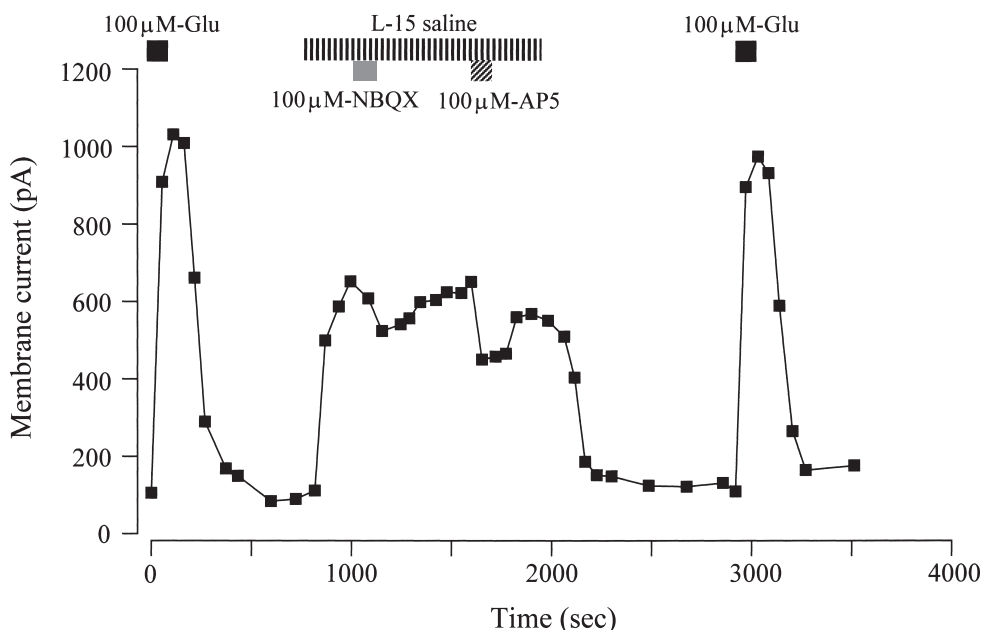
L-15リンガー液灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対するイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体阻害剤の作用

L-15リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化が、どのタイプのイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の活性化によるのかを明らかにするため、イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の阻害剤である 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; Kainic acid (KA)/(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の阻害剤) と D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5; N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の阻害剤) の投与実験を実施した(第6図)。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約35分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +105 pA 程の膜電流(保持電流)が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μ M) を投与すると、水平細胞には 1030 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流すと、元の膜電流にまで戻った。L-15リンガー液 (L-15 saline) を灌流すると、650 pA 程の外向き電流が発生した。この膜電流変化は、L-グルタミン酸投与によって発生した膜電流変化に比べて時間経過が緩やかであった。L-15リンガー液の灌流中、NBQX (100 μ M) を投与すると、膜電流は +650 pA から +525 pA まで減少した。NBQX を洗い流すと、+650 pA 付近まで回復した。次に、AP5 (100 μ M) を投与すると、膜電流は +650 pA から +450 pA にまで減少した。AP5 を洗い流しても、膜電流は +570 pA までしか回復しなかった。L-15リンガー液を標準リンガー液に戻すと、外向き電流は消失し、膜電流は +110 pA まで戻った。再度 L-グルタミン酸 (100 μ M) を投与すると、980 pA の外向き電流が現れ、これを洗い流すと概ね元の膜電流にまで戻った。

以上の結果から、L-15リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化は NMDA 型のみならず KA/AMPA 型グルタミン酸受容体の活性化によることが示唆された。ただし、

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞の膜電流



第 6 図：L-15 リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対する NBQX と AP5 の影響

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 35 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、約 +105 pA の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM) を投与すると、1030 pA 程の外向き電流が惹起された。L-グルタミン酸を洗い流し、膜電流が元に戻った後、L-15 リンガー液 (L-15 saline) を灌流した。水平細胞には約 650 pA の外向き電流が発生した。この膜電流変化は、L-グルタミン酸投与によって発生した膜電流変化に比べて時間経過が緩やかであった。L-15 リンガー液の灌流中に 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo [f] quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; 100 μM) を投与すると、+650 pA から +525 pA まで膜電流は減少した。NBQX を洗い流して、膜電流が +650 pA 程に回復した時点で、D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5; 100 μM) を投与した。膜電流は +650 pA から +450 pA にまで減少し、AP5 を洗い流すと 570 pA にまで回復した。L-15 リンガー液を標準リンガー液に戻すと、外向き電流は消失し、膜電流は +110 pA にまで戻った。再度 L-グルタミン酸 (100 μM) を投与すると、980 pA の外向き電流が現れ、これを洗い流すと概ね元の膜電流にまで戻った。

両タイプのイオンチャネル直結型グルタミン酸阻害剤の効果は不完全であり、L-15 リンガー液の灌流に伴い水平細胞にはグルタミン酸受容体以外の受容体あるいは起電性トランスポーターなどの活性化が見込まれた。

考 察

Leibovitz's L-15 Medium の選択

Takahashi & Copenhagen (1992) は、キンギョ網膜の单相性水平細胞（赤錐体から主なシ

ナプス入力を受け取る水平細胞) に対する 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB; 代謝調節型グルタミン酸受容体アゴニスト) の作用が、水平細胞の細胞内水素イオン濃度 (pH) に依存していることを見つけた。水平細胞内 pH が低下 (酸性化) したとき、APB は赤錐体から単相性水平細胞へのシナプス伝達を抑制し、そして水平細胞内 pH が上昇 (アルカリ化) したとき、APB は無効であった。APB が錐体水平細胞に対して直接作用するのかあるいは他の神経細胞を介して間接作用するのかを明らかにするため、アメリカナマズ網膜から錐体水平細胞を単離・培養し、この細胞に対する APB の作用を調べた。水平細胞を培養する際、重炭酸系の pH 緩衝作用を含まない人工培地 (Leibovitz's L-15 Medium) を選択した。Leibovitz's L-15 Medium を 70% に希釈し、29.17 mM NaCl, 1.62 mM CaCl₂, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES, そして 0.01 mg/ml BSA を加え、1 N-NaOH によって pH を 7.6 に調整した培養液を作製し、約 10°C に維持し利用した。培養水平細胞内を酸性化すると、APB はグルタミン酸投与に伴い発生する脱分極を濃度依存性に抑制した。つまり、APB は水平細胞に対し直接作用することが明らかとなった。近年、アメリカナマズ網膜の錐体水平細胞に 2 タイプの代謝調節型グルタミン酸受容体が発現している可能性が報じられたが、APB が水平細胞内酸性化でのみ効力を発揮する理由については未だ明らかになっていない (Linn & Gafka, 1999)。

爾来、著者は Leibovitz's L-15 Medium を希釈した培養液 (L-15 培養液) を魚類網膜から単離した水平細胞の培養に使用してきた。近年、L-15 培養液の作製に若干の変更を加え、Leibovitz's L-15 Medium を 85% に希釈し、これに 0.3 mM アスコルビン酸, 10.0 mM HEPES, そして 0.01 mg/ml BSA を加え、1N-NaOH によって pH を 7.6 に調整し用いている。この L-15 培養液を使用することで、アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を 4 週間にも及ぶ長期間培養することが可能であった。最近、培養期間の長期化に伴い水平細胞の生理応答が減弱するしくみを明らかにするため、L-15 培養液以外に、無機塩類を主成分とした培養液 (アミノ酸類やビタミン類を全く含まない無機塩類培養液) (16°C) を用いた培養を試みた (高橋, 2012a)。L-15 培養液を用いた培養と異なり、無機塩類培養液 (16°C) 中で水平細胞を長期間培養することはできず、せいぜい 10 日であった。両培養液で培養した水平細胞に L-グルタミン酸を投与し、発生する膜電流変化 (グルタミン酸電流) を記録そして比較した。不思議なことに、無機塩類培養液で培養した水平細胞に発生するグルタミン酸電流が L-15 培養液で培養した水平細胞に発生するグルタミン酸電流よりも有意に大きいことが明らかとなった。しかし、「L-15 培養液を用いて水平細胞を培養すると、なぜグルタミン酸電流が無機塩類培養液で培養した水平細胞のグルタミン酸電流に比べて減弱するのか。」について、その答を従来の研究成果から導き出すことはできなかった。これを説明するため、本研究では最も単純な仮説である「Leibovitz's L-15 Medium は、グルタミン酸受容体の活

性を抑える成分を含んでいるのか。」を調べることにした。

Leibovitz's L-15 Medium に含まれるグリシンの影響

Leibovitz's L-15 Medium には、無機塩類などに加えて17種類のアミノ酸と8種類のビタミンが含まれている(第1表)。ビタミン類はともかく、アミノ酸類はリガンド受容体の活性化や起電性トランスポーターによる取り込みを誘発する可能性がある。これまでの研究によって、魚類の水平細胞には少なくともグルタミン酸受容体とグルタミン酸トランスポーター、GABA受容体とGABAトランスポーター、ドーパミン受容体そしてグリシン受容体などが発現していることが明らかとなっている(例えば、Lasater, & Dowling, 1982; Schwartz, 1982, 1987, 2002; Qian & Dowling, 1993; Takahashi *et al.*, 1995a, b; 高橋, 2012a, b)。

Leibovitz's L-15 Medium には2.67 mMものグリシンが含まれおり、L-15 リンガー液を製するため85%に希釈して用いたとしても約2.27 mMが残存する(第1表参照)。本実験条件下で塩化物イオン(Cl^-)の平衡電位が0 mV付近にあることを考慮すれば、+35 mVに膜電位固定された水平細胞にグリシンは外向き電流を発生する筈である(高橋, 2012b)。グリシン電流は応答が速くそして顕著な脱感作を示すことが知られているが、本研究で採用した緩やかな灌流では一過性の膜電流変化は発現せず、持続性の膜電流変化が発生することが予想される(例えば、Cui *et al.*, 2003; Wang & Slaughter, 2005)。L-15 リンガー液の灌流に伴い+35 mVに膜電位固定した水平細胞に発生する持続性の外向き電流は、イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体阻害剤の投与(キヌレン酸, NBQXとAP5)で20~35%しか抑制されず、残存する持続性膜電流にグリシン受容体活性化に基因する成分が含まれている可能性がある(第5図と第6図参照)。L-15 培養液の水平細胞に対する作用にグリシン受容体が関与しているか否かを明らかにするため、今後グリシン受容体阻害剤の投与実験を行う必要がある。

Leibovitz's L-15 Medium に含まれる L-グルタミンの影響

L-15 リンガー液の灌流に伴い水平細胞に発生した外向き電流は、イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の阻害剤であるキヌレン酸(1 mM)、NBQX(100 μM)やAP5(100 μM)の投与によって阻害される(第5図と第6図)。この結果は、Leibovitz's L-15 Medium にグルタミン酸受容体を活性化する成分が含まれていることを示唆している。しかし、第1表から明らかのように、Leibovitz's L-15 Medium にはL-グルタミン酸もL-アスパラギン酸も含まれていない。

Yamada & Rothman (1989) はラットの培養海馬細胞に対するL-グルタミンの生理機能と

神経毒性を調べる研究において、Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich Co. の旧会社名) から購入したL-グルタミンに微量のL-グルタミン酸が混入していることを見つけた。結果として、培養海馬細胞に対するL-グルタミンの作用が、混入しているL-グルタミン酸によることを報告している。実際、Sigma-Aldrich Co. から販売されている数種類のL-グルタミンの中で、製品番号G3126のL-グルタミンには0.5%未満のL-グルタミン酸が含まれていることがカタログに明記されている。仮にこのL-グルタミンを1 mMで使用すると、5 μ M 未満のL-グルタミン酸が含まれることになる。このL-グルタミン酸濃度は、グルタミン酸受容体を活性化するに足る濃度である。L-グルタミン酸のL-グルタミンへ中への混入については、アフリカツメガエルの培養脊髄神経細胞を用いた研究でも報じられている (Sands & Barish, 1989)。この論文には、L-グルタミンをFluka, FlowそしてAldrich (Sigma-Aldrich Co. の旧会社名) の3社から購入したことが記載されている。L-グルタミンは多くの薬品会社で製造されているが、何れの会社で製造されたL-グルタミンも純度は100%ではない。勿論、GibcoがLeibovitz's L-15 Mediumを製造する際に使用しているL-グルタミンにもL-グルタミン酸が混入している可能性は充分ある。もしL-グルタミン酸が混入していれば、Leibovitz's L-15 Mediumを用いて培養した神経細胞に発現するグルタミン酸受容体はこれを検出するに違いない。

Kolbaev & Draguhn (2008) は、L-グルタミンが微量のL-グルタミン酸を含んでいることを承知した上で、L-グルタミンをラットの培養海馬細胞に投与し、この細胞に発生する膜電流変化が混入するL-グルタミン酸ではなくL-グルタミンによることを報告している。この研究では、L-グルタミンが部分的にNMDA型グルタミン酸受容体を活性化して膜電流を発生すること、そしてL-グルタミンは未知の機序を介して膜電流を発生することを明らかにした。これを踏まえると、本研究で用いたL-15リンガー液の水平細胞に対する効果が①L-15リンガー液に混入するL-グルタミン酸(濃度不明)によるグルタミン酸受容体の活性化(NBQX [AMPA/KA型グルタミン酸受容体阻害剤]とAP5 [NMDA型グルタミン酸受容体阻害剤]による抑制効果)、②L-15リンガー液に含まれる約1.74 mMのL-グルタミンによるグルタミン酸受容体の活性化、そして③約1.74 mMのL-グルタミンによる未知の作用、の総てあるいはいくつかを介して発現していると予想される。また、Kolbaev & Draguhn (2008) は、グルタミン酸投与に比べ、グルタミン投与では立ち上がりの緩やかな膜電流成分が発生することも報告している。本研究でもL-15リンガー液の灌流に伴う水平細胞の膜電流応答の発生はグルタミン酸投与に比べてかなり緩やかであり、L-15リンガー液に含まれるL-グルタミンが水平細胞にある未知のしくみを介している可能性も否定できない。今後、L-15リンガー液による膜電流応答がL-グルタミン酸の予期せぬ混入によるのか、L-グルタミンのグルタミン酸受容体への直接作用であるのか、あるいは全く新しいグルタミン受容体

が存在するのかなどを明らかにする必要がある。

L-グルタミン酸：興奮性神経伝達

イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体は生理学および薬理的な違いから、(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型, Kainic acid (KA) 型そして N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型の3種類に分類されている。この中で、中枢神経系では AMPA 型グルタミン酸受容体が主に機能していると考えられている。この受容体の活性化に伴う膜電流は、 Na^+ や K^+ に加え Ca^{2+} によって運ばれる。また、他のグルタミン酸受容体と違い、この AMPA 型グルタミン酸受容体は活性化が速く、顕著な脱感作を示すことも知られている (例えば, Robert & Howe, 2003)。アメリカナマズ網膜水平細胞の細胞膜には、総てのイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現していることが報告されている (O'Dell & Christensen, 1986, 1989; Eliazof & Jahr, 1997)。この水平細胞が L-15 リンガー液 (L-15 培養液) に長期間暴露されたとき、AMPA 型グルタミン酸受容体は持続的に活性化し、この受容体の感受性が低下 (脱感作) する可能性がある。このため、L-15 リンガー液 (L-15 培養液) への長期間暴露後に水平細胞に発生するグルタミン酸電流は、無機塩類培養液で同期間培養した水平細胞よりも小さくなったのかもしれない。

近年、NMDA 型グルタミン酸受容体と共に、AMPA 型グルタミン酸受容体はシナプスの可塑性に参与する重要な受容体として注目を集めている。例えば、マウス脳の高馬 CA1 領域にある錐体細胞には長期抑圧 (特定の神経細胞間のシナプス伝達効率の長期的な抑制) という現象が知られており、記憶や学習に参与していると考えられている。この長期抑圧は NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化に伴う細胞内への Ca^{2+} 流入がきっかけとなり、エンドサイトーシスによって AMPA 受容体が細胞内へり込まれることで終了することが知られている (Wang & Linden, 2000; Brecht & Nicoll, 2003)。つまり、この長期抑圧は細胞膜上の AMPA 型グルタミン酸受容体数の減少によって発現する。最近、錐体細胞内に流入した Ca^{2+} がフォファターゼを制御することによってホスファチジルイノシトール-4-リン酸-5-キナーゼ γ 661 (脂質合成酵素の一種) を活性化し、これがホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸 (脂質分子の一種) の活性化を引き起こして AMPA 型グルタミン酸受容体を細胞内にエンドサイトーシスすることが明らかとなった (Unoki *et al.*, 2012)。残念ながら、脊椎動物網膜に長期抑圧が発生するという報告はない。しかし、L-15 リンガー液 (L-15 培養液) への長期間の暴露に伴い水平細胞の NMDA 型グルタミン酸受容体が持続的に活性化し、これに伴い細胞内で上昇した Ca^{2+} が AMPA 型グルタミン酸受容体の数を減少させる可能性は十分に考えられる。

L-グルタミン酸：興奮毒性

脳や網膜において、L-グルタミン酸は代表的な興奮性神経伝達物質である。ところが、このL-グルタミン酸が脳内や網膜内に過剰に存在すると、興奮毒性を示すことが知られている（例えば、Lucas & Newhouse, 1957; Olney, 1969）。このため、神経終末から放出されたL-グルタミン酸は、放出した神経細胞自身ならびに周囲のグリア細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターによって速やかに回収される。この興奮毒性には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を伴う NMDA 型および AMPA 型グルタミン酸受容体が関与していることが報告されている（例えば、Lynch & Guttman, 2002）。これらの受容体の関与は、興奮毒性がイオンチャンネル直結型グルタミン酸受容体の阻害剤の投与によって抑えられることから明らかである（Olney *et al.*, 1989; Sheardown *et al.*, 1990）。近年、L-グルタミン酸による興奮毒性はてんかんや脳虚血などの急性の疾患のみならずアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの長い経過を経て発症する神経性疾患の原因としても注目を集めている（例えば、Mark *et al.*, 2001; Foran & Trotti, 2009）。細胞外のL-グルタミン酸濃度の異常な上昇に伴うグルタミン酸受容体の活性化が、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことで興奮毒性が始まると考えられている（グルタミン酸-カルシウム仮説）。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はカルパイン（タンパク質分解酵素の一種）やフォスホリパーゼ（脂質分解酵素の一種）などの活性を上げ、興奮毒性を発揮すると推測されている。これらに加え、フリーラジカルや一酸化窒素形成が興奮毒性に関与している可能性も報じられている。

L-15リンガー液（L-15 培養液）を用いて水平細胞を培養したとき、水平細胞に発現する NMDA 型や AMPA 型グルタミン酸受容体が活性化すると考えられる（第6図参照）。これらのグルタミン酸受容体の活性化が水平細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることに加え、これらの受容体の活性化に伴って生じる脱分極がL型カルシウムチャンネルを活性化して水平細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることが予想される。水平細胞の培養が長期化すると、細胞内には Ca^{2+} が蓄積し、最終的に興奮毒性が発現する可能性がある。興奮毒性のしくみは十分に解明されているわけではないが、興奮毒性が発現するまでの過程で水平細胞のグルタミン酸受容体数の減少あるいは感受性の低下が徐所に進行し、この結果としてグルタミン酸に対する応答性が減弱することが考えられる。興奮毒性の発現とグルタミン酸受容体との関係については、今後の研究を待たざるを得ないのが現状である。

謝 辞

筆者は広島修道大学派遣研究制度を活用し、平成22年4月から平成23年3月までの1年間米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部眼科学教室において「脊椎動物網膜外網状

層におけるシナプス連絡の神経生物学的研究」を実施した。本稿は、その研究の一部である。カリフォルニア大学サンフランシスコ校での研究実施に際し、実験室ならびに研究機器・器具・薬品類の使用を許可して下さった眼科学教室教授 David R. Copenhagen 博士に深甚なる感謝の意を表する。

引用文献

- Ayoub, G. S., Korenbrot, J. and Copenhagen D. R. (1989), Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard, *Neurosci. Res.*, **Suppl.10**: 47–57.
- Baldrige, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. C. (1987), Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **265**: 428–436.
- Baldrige, W. H., Vaney, D. I. and Weiler, R. (1998), The modulation of intracellular coupling in the retina, *Sem. Cell Develop. Biol.*, **9**: 311–318.
- Bredt, D. S. and Nicoll, R. A. (2003), AMPA receptor trafficking at excitatory synapses, *Neuron*, **40**: 361–379.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- Burkhardt, D. A. and Hassin G. (1978), Influences of cones upon chromatic- and luminosity-type horizontal cells in pikeperch retinas, *J. Physiol.*, **281**: 125–137.
- Byzov, A. L. and Shura-Bura, T. M. (1986), Electrical feedback mechanism in the processing of signals in the outer plexiform layer of the retina, *Vision Res.*, **26**: 33–44.
- Cadetti, L. and Thoreson, W. B. (2006), Feedback effects of horizontal cell membrane potential on cone calcium currents studied with simultaneous recordings, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1992–1995.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- Copenhagen, D. R. and Owen W. G. (1976), Functional characteristics of lateral interactions between rods in the retina of the snapping turtle, *J. Physiol.*, **259**: 251–282.
- Cui, J., Ma, Y.-P., Lipton, S. A. and Pan, Z.-H. (2003), Glycine receptors and glycinergic input at the axon terminals of mammalian retinal rod bipolar cells, *J. Physiol.*, **553**: 895–909.
- Davis, G. W. and Naka, K.-I. (1980), Spatial organization of catfish retinal neurons: I. Single- and random-bar stimulation, *J. Neurophysiol.*, **43**: 807–831.
- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1992), Hemi-gap junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina, *J. Physiol.*, **445**: 201–230.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1993), Glutamate suppresses HVA calcium currents in catfish horizontal cells by raising intracellular proton concentration, *Neuron*, **11**: 267–277.
- Eliasof, S. and Jahr, C. E. (1997), Rapid AMPA receptor desensitization in catfish cone horizontal cells, *Vis. Neurosci.*, **14**: 13–18.
- Famiglietti, E. V. Jr, Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina, *Science*, **198**: 1267–1269.
- Foran, E. and Trotti, D. (2009), Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**: 1587–1602.
- Hagins, W. A., Penn, R. D. and Yoshikami, S. (1970), Dark current and photocurrent in retinal rods, *Biophys. J.*, **10**: 380–412.
- Hamill, O. P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.*, **391**: 85–100.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Hirasawa, H. and Kaneko, A. (2003), pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from

- horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca^{2+} channels, *J. Gen. Physiol.*, **122**: 657–671.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol.*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol.*, **213**: 95–105.
- Kawamura, S. (1993), Molecular aspects of photoreceptor adaptation in vertebrate retina, *Int. Rev. Neurobiol.*, **35**: 43–86.
- Kawamura, S. (1994), Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction, *Neurosci. Res.*, **20**: 293–298.
- Kolbaev, S. and Draguhn, A. (2008), Glutamine-induced membrane currents in cultured rat hippocampal neurons, *Eur. J. Neurosci.*, **28**: 535–545.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1982), Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 936–940.
- Leibovitz, A. (1963), The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere, *Am. J. Hyg.*, **78**: 173–180.
- Linn, C. L. and Gafka, A. C. (1999), Activation of metabotropic glutamate receptors modulates the voltage-gated sustained calcium current in a teleost horizontal cell, *J. Neurophysiol.*, **81**: 425–434.
- Lucas, D. R. and Newhouse, J. P. (1957), The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, *AMA Arch. Ophthalmol.*, **58**: 193–201.
- Lynch, D. R. and Guttmann, R. P. (2002), Excitotoxicity: Perspectives based on N-Methyl-D-Aspartate receptor subtype, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **300**: 717–723.
- MacNichol, E. F. Jr. and Svaetichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalmol.*, **46**: 29–46.
- Mark, L. P., Prost, R. W., Ulmer, J. L., Smith, M. M., Daniels, D. L., Strottmann, J. M., Brown, W. D. and Haccin-Bey, L. (2001), Pictorial review of glutamate excitotoxicity: Fundamental concepts for neuroimaging, *Am. J. Neuroradiol.*, **22**: 1813–1824.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol.*, **334**: 325–349.
- Murakami, M. and Shimoda, Y. (1977), Identification of amacrine and ganglion cells in the carp retina, *J. Physiol.*, **264**: 801–818.
- Murakami, M. and Takahashi, K.-I. (1987), Calcium action potential and its use for measurement of reversal potentials of horizontal cell responses in carp retina, *J. Physiol.*, **386**: 165–180.
- Murakami, M., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, *Prog. Ret. Eye Res.*, **14**: 197–221.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **227**: 899–913.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Naka, K.-I. and Otsuka, T. (1974), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. II. Morphological identification, *J. Neurophysiol.*, **38**: 72–91.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells, *J. Physiol.*, **223**: 449–460.
- O'Dell, T. and Christensen, B. N. (1986), N-methyl-n-aspartate receptors coexist with kainate and quisqualate receptors on single isolated catfish horizontal cells, *Brain Res.*, **381**: 59–362.
- O'Dell, T. and Christensen, B. N. (1989), Horizontal cells isolated from catfish retina contain two types of excitatory amino acid receptors, *J. Neurophysiol.*, **61**: 1097–1109.
- Olney, J. W. (1969), Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, *Science*, **164**: 719–721.

- Olney, J. E., Labruyere, J. and Price, M. T. (1989), Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs, *Science*, **244**: 1360–1362.
- Otsuka, T. (1978), Combination of oil droplets with different types of photoreceptor in a freshwater turtle, *Geoclemys reevesii*, *Sensory Process*, **2**: 321–325.
- Penn, R. D. and Hagins, W. A. (1969), Signal transmission along the retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave, *Nature*, **223**: 201–205.
- Picones, A. and Korenbrot, J. I. (1994), Analysis of fluctuations in the cGMP-dependent currents of cone photoreceptor outer segments, *Biophys. J.*, **66**: 360–365.
- Qian, H. and Dowling, J. E. (1993), Novel GABA responses from rod-driven horizontal cells, *Nature*, **361**: 162–164.
- Robert, A. and Howe, J. R. (2003), How AMPA receptor desensitization depends on receptor occupancy, *J. Neurosci.*, **23**: 847–858.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982a), Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 251–256.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982b), Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 257–262.
- Sands, S. B. and Barish, M. E. (1989), NMDA receptor activation by residual glutamate in glutamine preparations: a cautionary note regarding weak NMDA receptor agonists, *Brain Res.*, **495**: 193–197.
- Schwartz, E. A. (1982), Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina, *J. Physiol.*, **323**: 211–227.
- Schwartz, E. A. (1987), Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- Schwartz, E. A. (2002), Transport-mediated synapses in the retina, *Physiol. Rev.*, **82**: 875–891.
- Sheardown, M. J., Nielsen, E. O., Hansen, A. J., Jacobsen, P. and Honore, T. (1990), 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia, *Science*, **247**: 571–574.
- Shimoda, Y., Hidaka, S., Maehara, M. Lu. Y. and Hashimoto, Y. (1992), Hyperpolarizing interplexiform cell of the dace retina identified physiologically and morphologically, *Vis. Neurosci.*, **8**: 193–199.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1983), Sodium and calcium currents measured in isolated catfish horizontal cells under voltage clamp, *Neuroscience*, **10**: 839–897.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1986), Excitable properties and voltage-sensitive ion conductances of horizontal cells isolated from catfish (*Ictalurus punctatus*), *J. Neurophysiol.*, **56**: 32–49.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. (1983), Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **345**: 329–351.
- 高橋恭一 (2000), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の形態変化, *経済科学研究*, **4** (1): 77–99.
- 高橋恭一 (2012a), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞のグルタミン酸電流の経日変化. *人間環境学研究*, **10**: 1–30.
- 高橋恭一 (2012b), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞に対するグリシンの効果, *人間環境学研究*, **10**: 31–51.
- Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1992), APB suppresses synaptic input to retinal horizontal cells in fish: a direct action on horizontal cells modulated by intracellular pH, *J. Neurophysiol.*, **67**: 1633–1642.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1987), Reversal potentials of rod horizontal cell responses in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl.6**: 165–174.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1988), Subtype of excitatory amino acid receptor in cone horizontal cells of the carp retina as specified by reversal potential measurement technique, *Neurosci. Res.*, **5**: 453–464.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.

- Takahashi, K.-I., Dixon, D. B. and Copenhagen, D. R. (1993), Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina, *J. Gen. Physiol.*, **101**: 695–714.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1995a), GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABA_A receptor channels, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 437–456.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S., Kaneko, A. and Copenhagen, D. R. (1995b), Actions of nipecotic acid and SKF89976A on GABA transporter in cone-driven horizontal cells dissociated from the catfish retina, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 457–473.
- Tauchi, M., Madigan, N. M. and Masland, R. H. (1990), Shapes and distributions of the catecholamine-accumulating neurons in the rabbit retina, *J. Comp. Neurol.*, **293**: 178–189.
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559–566.
- Tomita, T., Kaneko, T., Murakami, M. and Pautler, E. L. (1967), Spectral response curves of single cones in the carp, *Vision Res.*, **2**: 519–531.
- Toyoda, J.-I. and Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400.
- Toyoda, J.-I., Nosaki, H. and Tomita, T. (1969), Light induced resistance changes in single photoreceptors of *Necturus* and *Gekko*, *Vision Res.*, **9**: 453–463.
- Tsukamoto, Y., Yamada, M. and Kaneko, A. (1987), Morphological and physiological studies of rod-driven horizontal cells with special reference to the question of whether they have axons and axon terminals, *J. Comp. Neurol.*, **255**: 305–316.
- Trifonov, Yu. A. (1968), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817.
- Unoki, T., Matsuda, S., Kakegawa, W., Ngo Thai Bich Van, Hohda, K., Suzuki, A., Funakoshi, Y., Hasegawa, H., Yuzaki, M. and Kanaho, Y. (2012), NMDA receptor-mediated PIP5K activation to produce PI (4,5) P2 is essential for AMPA receptor endocytosis during LTD, *Neuron*, **73**: 135–148.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **252**: 93–101.
- Vessey, J. A., Stratis, A. K., Daniels, B. A., Silva, N. D., Jonz, M. G., Lalonde, M. R., Baldrige, W. H and Barnes, S. (2005), Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse, *J. Neurosci.*, **25**: 4108–4117.
- Wang, P. and Slaughter, M. M. (2005), Effects of GABA receptor antagonists on retinal glycine receptors and on homomeric glycine receptor alpha subunits, *J. Neurophysiol.*, **93**: 3120–3126.
- Wang, Y. T. and Linden, D. J. (2000), Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis, *Neuron*, **25**: 635–647.
- Watanabe, S.-I. and Murakami, M. (1991), Similar properties of cGMP-activated channels between cones and rods in the carp retina, *Vis. Neurosci.*, **6**: 563–568.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*: II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Witkovsky, P., Owen, W. G. and Woodworth, M. (1983), Gap junctions among the perikarya, dendrites, and axon terminals of the luminosity-type horizontal cell of the turtle retina, *J. Comp. Neurol.*, **216**: 359–368.
- Witkovsky, P., Gabriel, R., Krizaj, D. and Akopian, A. (1995), Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3556–3560.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinae, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.
- Yamada, K. A. and Rothman, S. M. (1989), Glutamine currents in hippocampal neurons are attributable to contaminating glutamate, *Brain Res.*, **498**: 351–354.